

EAVU

PCT/JP99/01607

26.04.99

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application:

1998年 4月 1日

REC'D 17 MAY 1999

WIPO PCT

出 願 番 号  
Application Number:

平成10年特許願第088569号

出 願 人  
Applicant(s):

サントリー株式会社

PRIORITY  
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年 4月 9日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

伴佐山 建志



出証番号 出証特平11-3022596

特平10-08856

【書類名】 特許願

【整理番号】 98SN084

【あて先】 特許庁長官殿

【発明の名称】 新規溶血活性蛋白質

【請求項の数】 6

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府三島郡島本町若山台1丁目1番1号 サントリー  
研究センター内

【氏名】 永井 宏史

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府三島郡島本町若山台1丁目1番1号 サントリー  
研究センター内

【氏名】 中嶋 暉躬

【特許出願人】

【識別番号】 000001904

【氏名又は名称】 サントリー株式会社

【代理人】

【識別番号】 100083301

【弁理士】

【氏名又は名称】 草間 攻

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 053958

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9717858

【ブルーフの要否】 要

特平10-088569

【書類名】 明細書  
【発明の名称】 新規溶血活性蛋白質  
【特許請求の範囲】

【請求項1】 次の特性：

- ① 溶血活性を有し；
  - ② 分子量が約50,000（SDSゲル電気泳動法による）であり；
  - ③ 以下の部分アミノ酸配列を有する、
    - (1) Gly-Glu-Ile-Gln-Thr-Lys-Pro-Asp-Arg-Val-Gly-Gln-Ala-Thr
    - (2) Gly-Asn-Ala-Glu-His-Val-Ala-Ser-Ala-Val-Glu-Asn-Ala-Asn-Arg-Val-Asn-Lys
    - (3) Met-Ser-Asp-Gly-Phe-Tyr-Thr-Met-Glu-Asn-Ser-Asp-Arg-Arg-Lys（式中、アミノ酸残基はIUPACおよびIUBの定める3文字表記により表記する）；
- を有する蛋白質。

【請求項2】 アンドンクラゲ (*Carybdea rastonii*) の刺胞をリン酸緩衝液中で超音波処理し、遠心分離したその上清をイオン交換高速液体クロマトグラフィー、およびゲル濾過高速液体クロマトグラフィーにより抽出・精製して得られる請求項1記載の蛋白質。

【請求項3】 アンドンクラゲ (*Carybdea rastonii*) の刺胞をリン酸緩衝液中で超音波処理し、遠心分離したその上清をイオン交換高速液体クロマトグラフィー、およびゲル濾過高速液体クロマトグラフィーにより抽出・精製することを特徴とする請求項1記載の蛋白質の製造法。

【請求項4】 その生理活性を保持したまま抽出・精製する請求項3記載の蛋白質の製造法。

【請求項5】 請求項1または2記載の蛋白質を有効成分とする医薬。

【請求項6】 血小板凝集作用を有するものである請求項5記載の医薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、溶血活性を有する新規蛋白質、その製造法ならびに該蛋白質が所有する生理活性を利用した試薬、農薬、医薬に関する。

【0002】

【従来の技術】

海水浴中におけるクラゲによる刺傷被害は、世界各地で発生しており、我が国でも毎年夏場の海水浴シーズンにアンドンクラゲ (*Carybdea rastoni*) やカツオノエボシ (*Physalia physalis*) による刺傷被害が頻発している。刺傷による症状はクラゲの種類や、患者の個人差により程度が異なるが、その第一は、刺傷部位の疼痛、発赤、丘疹、小水泡などの皮膚症状である。重症例では、出血斑、壊死を起こし頭痛、発熱、吐気、呼吸困難、脈拍の変動などの全身症状を伴い死亡することもある。このような被害の多さにもかかわらず、その毒成分を明らかにするとともに、毒成分の薬理学的性質を解明し、クラゲによる刺傷時の治療用薬剤などの開発につなげようとすることはあまり行われていない。

【0003】

アンドンクラゲの毒成分については、佐藤らによって研究が行われており、アンドンクラゲの蝕手の凍結乾燥物から調製した粗抽出液中には、溶血、血小板凝集、肥満細胞脱顆粒、血管平滑筋収縮、皮膚壊死、心臓毒性および致死などの活性を示す成分が存在することを明らかにし、その毒成分の血小板凝集作用および血管平滑筋収縮作用について検討がなされている（佐藤昭彦：アンドンクラゲの毒成分の研究、お茶の水医学雑誌，33巻，2号，131-151頁，昭和60年6月）。

【0004】

一方、クラゲ毒の成分としては、その刺胞毒が酸、アルカリ処理、加熱処理、有機溶媒処理、プロテアーゼ処理などで失活し、透析されない高分子物質であることから、その主体は蛋白質であると考えられている。

そして、これまでクラゲ由来の蛋白毒の精製も試みられてきたが、クラゲ毒自体は非常に失活しやすいことから、これまではこれらの活性成分について、例えば、その溶血活性を保持したまま単離、精製することは行われておらず、その物理的、化学的な性質も明らかにされていなかった。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

クラゲ毒成分の詳細を解明することは、その蛋白質が有する多種多様な生理活性、なかでも特異的溶血活性、血小板凝集作用を応用した医薬品等の開発のために、極めて重要な事項である。したがって、溶血活性を有する蛋白質の構造-活性相関、種特異性等の研究のために、できるだけ多くの溶血活性を有する蛋白質またはペプチドを、その生理活性を保持したまま単離し、これらの発生学上または構造上の類似点を究明する手段を与えるとともに、クラゲによる刺傷被害の治療に使用することができる医薬品等の開発へのアプローチを与えることが、本発明が解決しようとする課題である。

【0006】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、アンドンクラゲの刺胞からその溶血活性を指標に、溶血活性を有する蛋白質を、活性を保持したまま単離すべく鋭意研究を行い、活性を保持したままの蛋白質を単離、精製する方法を見出すとともに、その部分化学構造が次のアミノ酸配列式(1)～(3)：

【0007】

アミノ酸配列式(1)：

Gly-Glu-Ile-Gln-Thr-Lys-Pro-Asp-Arg-Val-Gly-Gln-Ala-Thr

【0008】

アミノ酸配列式(2)：

Gly-Asn-Ala-Glu-His-Val-Ala-Ser-Ala-Val-Glu-Asn-Ala-Asn-Arg-Val-Asn-Lys

【0009】

アミノ酸配列式(3)：

Met-Ser-Asp-Gly-Phe-Tyr-Thr-Met-Glu-  
Asn-Ser-Asp-Arg-Arg-Lys

(上記の各式中、アミノ酸残基はIUPACおよびIUBの定める3文字表記により表記する)

であり、分子量が約50,000(SDSゲル電気泳動法による)を有する蛋白質であることを明らかにして、本発明を完成した。

【0010】

したがって、本発明の一つの態様としては、上記した生理活性および物理的、化学的性質を特性として有する特異的蛋白質を提供し、また別の態様としてかかる蛋白質の製造法を提供し、さらに別の態様としては、これらの特性を利用した血小板凝集作用等を有する医薬を提供する。

【0011】

【発明の実施の形態】

本発明が提供する特異的生理活性を有する蛋白質は、具体的には次のようにして単離、精製することができる。例えば、アンドンクラゲの刺胞をリン酸緩衝液中で超音波処理した後、遠心分離して上清を集め粗抽出物を得る。この粗抽出物をTSK-GEL(東ソー社製)を用いたイオン交換高速液体クロマトグラフィーおよびSuperdex-75(Pharmacia社製)によるゲル濾過高速液体クロマトグラフィーに付して目的とする蛋白質を分離、精製することができる。

【0012】

かくして得られた本発明が提供する蛋白質の構造は、酵素を用いた選択的分解を組み合わせることで決定することができる。例えば、上記によって分離、精製した蛋白質をリジルエンドペプチダーゼで処理し、高速液体クロマトグラフィーによりその断片を分取後、アミノ酸シーケンサーなどを用いて分析することによってアミノ酸配列を決定することができる。

【0013】

かかる分析によって、本発明が提供する蛋白質は、その分子量が約50,00

0 (SDSゲル電気泳動法による)であり、その部分アミノ酸配列が上記したアミノ酸配列式(1)～(3)を有するものであることが確認された。

この部分アミノ酸配列の構造についてホモロジー検索を行った結果、今まで報告されている蛋白質と極めて相同性が低いものであった。したがって、本発明が提供する溶血活性を有する蛋白質は、既知の蛋白質には似ていない全く新しい蛋白質であることが示唆された。

#### 【0014】

本発明の特異的蛋白質の分離・精製による製法は、特にその溶血活性を保持したままの状態で行われることを特徴とする。かかる溶血活性を保持したままの分離・精製は、具体的には、上記したリン酸緩衝液による超音波処理、あるいは各種高速液体クロマトグラフィー等の処理を行うに際して、0.1M以上、好ましくは0.3M以上、より好ましくは0.5M以上のNaCl含有の10mMリン酸緩衝液(pH6.0)中で、10℃以下、好ましくは5℃以下で行うことによって達成されることが判明した。

したがって、本発明のアンドンクラゲの刺胞から蛋白質の抽出・精製による製造法においては、より具体的には、その生理活性を保持したまま行う製造法を提供するものでもある。

#### 【0015】

##### 【作用】

本発明が提供する蛋白質は、溶血活性を有する蛋白質であり、例えば血小板凝集作用等を有する医薬品としてばかりでなく、溶血に関する研究用の試薬として、さらにはクラゲによる刺傷時の治療用薬剤など医薬品開発への新たなアプローチを与える有用な試薬として利用することができる。

#### 【0016】

##### 【実施例】

以下に本発明を実施例によりさらに詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

#### 【0017】

##### 実施例1

1) アンドンクラゲ刺胞の抽出

神奈川県三浦海岸で採取し、マイナス80℃で凍結保存されていたアンドンクラゲの刺胞200mgを、10mMリン酸緩衝液(pH6.0)8ml中に入れ、超音波(井内社製 ultrasonic cleaner VS150)中で15分間処理した後、遠心分離(3,000rpm、20分間)し、その上清を集めた。この操作を計3回行った。さらに、1M NaCl含有10mMリン酸緩衝液(pH6.0)8mlにより同様の抽出操作をさらに3回繰り返し、そのすべての上清を集めた。この抽出操作後、直ちに次の精製段階であるイオン交換HPLC(高速液体クロマトグラフィー)を行った。

【0018】

2) イオン交換HPLC(カラム:TSK-GEL CM650S, カラムサイズ:20×220mm)による精製

標記カラムを、0.3M NaCl含有10mMリン酸緩衝液(pH6.0)にて平衡化した。平衡化後、次いで、上記1)の操作により抽出して得た上清を合わせて、10mMリン酸緩衝液(pH6.0)で4倍に希釈した後、上記カラムに、流速3ml/分にて供した。サンプルアプライ後、10mMリン酸緩衝液(pH6.0)100mlで洗浄した。洗浄後、60分間で0Mから0.7MのNaCl濃度によるグラジエント(10mMリン酸緩衝液:pH6.0)にて溶出を行った。グラジエント開始後、45分から65分の間に多くの溶血活性フラクションが溶出した。なお、溶血活性はヒツジ血球に対する溶血作用で調べた(後記実施例2を参照)。

【0019】

3) イオン交換HPLC(カラム:TSK-GEL CM5PW, カラムサイズ:7.5×75mm)による精製

標記カラムを、0.3M NaCl含有10mMリン酸緩衝液(pH6.0)でよく平衡化した。上記2)の精製操作により得られた溶血活性画分を、10mMリン酸緩衝液(pH6.0)で4倍に希釈後、上記カラムに、流速2ml/分にて供した。サンプルアプライ後、10mMリン酸緩衝液(pH6.0)30mlで洗浄した。洗浄後、60分間で0Mから0.8MのNaCl濃度によるグラ



ジェント(10mMリン酸緩衝液: pH6.0)にて溶出を行った。グラジエント開始後、25分から35分の間に多くの溶血活性フラクションが溶出した。分取した溶血活性を有する各フラクションをSDS-PAGEに供し、活性成分の分離具合を確認し、よく分離している部分を集めて次のステップにまわし、分離していない部分については何度も再クロマトグラフィーを繰り返した。

【0020】

4) イオン交換HPLC(カラム: TSK-GEL CM5PW, カラムサイズ: 7.5×75mm)による溶血活性成分の濃縮

カラムは、0.3M NaCl含有10mMリン酸緩衝液(pH6.0)でよく平衡化した。上記3)の精製操作で得られた溶血活性画分を、10mMリン酸緩衝液(pH6.0)で4倍に希釈後、上記カラムに、流速2ml/分にて供した。サンプルアプライ後、10mMリン酸緩衝液(pH6.0)30mlで洗浄した。洗浄後、0.8M NaCl含有10mMリン酸緩衝液(pH6.0)を流し、カラムに吸着したサンプルを溶出させた。溶媒を交換後5分前後に溶血活性成分が濃縮されて一気に溶出するので、その部分を分取する。

【0021】

5) ゲル濾過HPLC(カラム: Superdex-75, カラムサイズ: 16×600mm)による精製

イオン交換HPLCによって濃縮されたサンプルを、0.8M NaCl含有10mMリン酸緩衝液(pH6.0)で平衡化した上記カラムに0.5-1.0mlずつ供し、流速1ml/分で溶出させた。サンプルを注入後、50分から60分の溶出フラクションに強い溶血活性が見出された。SDS-PAGEで分離状況を確認後、活性画分を集め、ここで溶血毒である、本発明の蛋白質が単離された(約1マイクログラム)。

【0022】

実施例2: 溶血活性の測定

上記の実施例1における各精製段階での溶血活性の測定、ならびに最終的に得られた溶血毒である、本発明の蛋白質の溶血活性の測定は、以下のように行なった。

【0023】

1) 方法

溶血活性は、ヒツジ赤血球に対する溶血により測定した。すなわち、0.8%のヒツジ赤血球を含むPBS(+)緩衝液を96穴のマイクロウェルプレート(丸底タイプ)に200 $\mu$ l溶液ずつ入れ、そこに、上記実施例1の各精製段階で得られた画分を、10mMリン酸緩衝液(pH6.0)に溶解させた溶液10 $\mu$ lを加え、室温下に3時間放置し、各プレートのヒツジ赤血球の溶血状態を観察した。なお、溶血活性を保持しているか否かは、各精製段階でえられた画分について、完全溶血を示すか、示さないかで判断を行った。

【0024】

2) 結果

2-1) 上記実施例1の各精製段階で得られた画分は、ヒツジ赤血球に対し、完全溶血を示し、その溶血活性が保持されていることが判明した。

2-2) また、上記実施例1の5)の精製操作で最終的に得られた溶血毒を有する本発明の蛋白質については、その100ng/ml(約2nM)以下の濃度で、ヒツジ赤血球に対して完全溶血を引き起こした。

【0025】

実施例3：蛋白質の分子量の決定と部分構造の決定

3-1) 分子量の決定

実施例1の5)の精製操作で得られた溶血毒を有する本発明の蛋白質を、常法に従ってSDSゲル電気泳動(SDS-PAGE)させたときに現れるシングルバンドと、蛋白質分子量マーカー(Pharmacia社製)との比較により、本発明の蛋白質は、その分子量が約50,000の蛋白質であることが確認された。

【0026】

3-2) リジルエンドペプチダーゼによる分解

上記実施例1の5)の精製操作で得られた溶血毒を有する本発明の蛋白質10 $\mu$ gに、Achromobacter Protease I(Achromobacter lyticus M497-1株由来：資酒造社製)3pMを加

、10 mMのトリス-塩酸緩衝液 (pH 9.0) 中で30℃にて20時間イン  
 キュベートして、蛋白質の分解を行った。この酵素消化された蛋白質を高速液体  
 クロマトグラフィー (カラム: Bakerbond wide pore OD  
 S) に付し、60分間で10%から62%のアセトニトリル濃度によるグラジエ  
 ント (0.1%トリフロロ酢酸含有水) にて、流速0.7 ml/分で分離した。  
 その結果、保持時間19, 23および27分に各々溶出した3種類のペプチドフ  
 ラグメントを得た。

【0027】

3-3) 各フラグメントのアミノ酸シーケンサーによる構造決定

以上のようにして得られた3種のペプチドフラグメントについて、Shima  
 dzu PSQ-1 protein sequencer (島津製作所社製)  
 を使用して、常法に従ってそのアミノ酸配列を決定した。

その結果、3種のフラグメントは、以下のアミノ酸配列式 (1) ~ (3) を有  
 しているものであることが判明した。

【0028】

アミノ酸配列式 (1) :

Gly-Glu-Ile-Gln-Thr-Lys-Pro-Asp-Arg-  
 Val-Gly-Gln-Ala-Thr

【0029】

アミノ酸配列式 (2) :

Gly-Asn-Ala-Glu-His-Val-Ala-Ser-Ala-  
 Val-Glu-Asn-Ala-Asn-Arg-Val-Asn-Lys

【0030】

アミノ酸配列式 (3) :

Met-Ser-Asp-Gly-Phe-Tyr-Thr-Met-Glu-  
 Asn-Ser-Asp-Arg-Arg-Lys

(上記の各式中、アミノ酸残基はIUPACおよびIUBの定める3文字表記に  
 より表記する)

【0031】

平10-088564

された各フラグメントについて、  
メントはこれまでに報告されている蛋白質と極  
アンドンクラゲの刺胞よりその溶血活性を保持  
は、全く新しい蛋白質であることが示

られた本発明の新規な  
性および物理的、化学的特性と 上記した実施例に記載の  
有するものであり、  
が約50,000 (SDSゲル電気泳動法によ、を有し、  
その部分アミノ酸配列として、上記したアミノ酸配列式 (3) を  
異質な蛋白質であることが判明した。

【033】  
り効果】

供するアンドンクラゲの刺胞由来の溶血活性を有する蛋白質は、そ  
ホモロジー検索を行った結果から、既知の蛋白質には似ていない  
とあり、例えば溶血のメカニズム等を解明するための生化学試薬と  
ルでの構造活性相関の研究などにより、例えばクラゲによる刺  
と医薬品開発への新たなアプローチを与えるものであり、さ  
を有する医薬品として有用なものでもある。

出証特平11-3

【配列表】

【0034】

配列番号: 1

配列の長さ: 14

配列の型: アミノ酸

配列の種類: ペプチド

起源: アンドククラゲ (*Carybdea rastonii*)

配列:

Gly Glu Ile Gln Thr Lys Pro Asp Arg Val Gly Gln Ala Thr

1 5 10

【0035】

配列番号: 2

配列の長さ: 18

配列の型: アミノ酸

配列の種類: ペプチド

起源: アンドククラゲ (*Carybdea rastonii*)

配列:

Gly Asn Ala Glu His Val Ala Ser Ala Val Glu Asn Ala Asn Arg Val Asn Lys

1 5 10 15

【0036】

配列番号: 3

配列の長さ: 15

配列の型: アミノ酸

配列の種類: ペプチド

起源: アンドククラゲ (*Carybdea rastonii*)

配列:

Met Ser Asp Gly Phe Tyr Thr Met Glu Asn Ser Asp Arg Arg Lys

1 5 10 15

特平10-08856

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 溶血活性を有し、医薬品開発へのアプローチを与える新規な蛋白質の提供。

【解決手段】 次の特性：

- ① 溶血活性を有し；
- ② 分子量が約50,000（SDSゲル電気泳動法による）であり；
- ③ 以下の部分アミノ酸配列を有する、
  - (1) Gly-Glu-Ile-Gln-Thr-Lys-Pro-Asp-Arg-Val-Gly-Gln-Ala-Thr
  - (2) Gly-Asn-Ala-Glu-His-Val-Ala-Ser-Ala-Val-Glu-Asn-Ala-Asn-Arg-Val-Asn-Lys
  - (3) Met-Ser-Asp-Gly-Phe-Tyr-Thr-Met-Glu-Asn-Ser-Asp-Arg-Arg-Lys

（式中、アミノ酸残基はIUPACおよびIUBの定める3文字表記により表記する）；

を有する蛋白質であり、アンドクセラゲの細胞から単離・精製される。

【選択図】 なし

【書類名】 職権訂正データ  
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【提出日】 平成10年 4月 1日  
【特許出願人】  
【識別番号】 000001904  
【住所又は居所】 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目1番40号  
【氏名又は名称】 サントリー株式会社  
【代理人】 申請人  
【識別番号】 100083301  
【住所又は居所】 東京都千代田区飯田橋4丁目5番12号 岩田ビル  
7階 草間特許事務所  
【氏名又は名称】 草間 攻

特平10-088569

出願人履歴情報

識別番号 [000001904]

1. 変更年月日 1990年 8月13日  
[変更理由] 新規登録  
住 所 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目1番40号  
氏 名 サントリー株式会社